

申请号: 94191694.4

公开号: CN 1120846A

结晶金属- α -干扰素

Metal-Interferon- α Crystal

Abstract:

The present invention relates to zinc-interferon- α crystal and cobalt-interferon- α crystal. Its half life in serum is about 12 hours when inject α -2-IFN crystal into the primates. A method for producing a α -2-IFN crystal comprising forming a soluble solution of IFN α -2 and a metal acetate salt under conditions wherein supersaturation and metal alpha interferon crystals occur. Using a metal acetate salt of target metal to balance the soluble metal- α -2-IFN. The shapes of the metal- α -IFN crystal are monoclinical, sheet, and spiculate.



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 94191694.4

[51] Int. Cl⁶

C07K 14 / 56

[43] 公开日 1996 年 4 月 17 日

[22] 申请日 94.2.24

[30] 优先权

[32] 93.2.25 [33] US[31] 08 / 024,330

[86] 国际申请 PCT / US94 / 01729 94.2.24

[87] 国际公布 WO94 / 19373 英 94.9.1

[85] 进入国家阶段日期 95.10.5

[71] 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 P·赖赫特 C·麦尼马

N·纳加布山 T·L·纳加布山

S·廷多尔 A·卢扎

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜 魏金玺

A61K 38 / 21 C30B 28 / 04

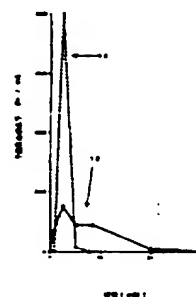
C30B 29 / 58

权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 结晶金属- α -干扰素

[57] 摘要

本发明提供了结晶的锌- α -2-干扰素 (α -2-IFN)。本发明进一步提供了结晶的钴- α -2-IFN, 并且当结晶 α -2-IFN 注射入灵长类时, 其血清半衰期至少约 12 小时。本发明进一步提供一种生产结晶 α -2-IFN 的方法, 包括形成可溶的金属- α -2-IFN 配合物, 并且在将要引起金属- α -2-IFN 溶液过饱和并生成结晶金属- α -2-IFN 的条件下, 在溶液中用一种该金属的乙酸盐平衡该可溶的金属- α -2-IFN 配合物。本发明也包括单斜晶形, 片形和针形形态的结晶金属- α 干扰素。



(BJ) 第 1456 号

权利要求书

1. 单斜晶形态的结晶锌- α -2-IFN。

2. 根据权利要求1的结晶锌- α -2-IFN, 其中结晶锌- α -2-IFN经X-射线衍射分析, 分辨率为大约 $3.0 \times 10^{-10}\text{m}(\text{\AA})$ 。

3. 根据权利要求2的结晶锌- α -2-IFN, 其中锌- α -2-IFN是锌- α -2b-IFN。

4. 根据权利要求3的结晶锌- α -2-IFN, 其中结晶锌- α -2-IFN具有晶胞系数为 $a = 151.4 \times 10^{-10}\text{m}(\text{\AA})$, $b = 76.6 \times 10^{-10}\text{m}(\text{\AA})$, $c = 63.1 \times 10^{-10}\text{m}(\text{\AA})$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 91.2^\circ$ 且 $\gamma = 90^\circ$ 的空间群 $P 2_1$ 。

5. 根据权利要求4的结晶锌- α -2-IFN, 其中锌- α -2-IFN是锌- α -2b-IFN。

6. 根据权利要求1的结晶锌- α -2-IFN, 其中结晶锌- α -2-IFN在药学上可接受的缓冲液中在 37°C 稳定至少24小时。

7. 根据权利要求1的结晶锌- α -2-IFN, 其中结晶锌- α -2-IFN在pH 5~6的药学上可接受的缓冲液中在 4°C 至 37°C 之间的温度下稳定至少24个小时。

10. 结晶 α -2-IFN, 其中所述结晶 α -2-IFN在pH在5~6之间的药学上可接受的缓冲液中在 37°C 下稳定至少24个小时。

11. 根据权利要求10的结晶 α -2-IFN, 其中所述结晶 α -2-IFN在pH为5~6之间的药学上可接受的缓冲液中在 4°C 至 37°C 之间的温度下, 稳定至少24小时。

1 2 . 结晶锌 - α - 2 - IFN, 其中锌离子与 α - 2 - IFN 的摩尔比是每摩尔 α - 2 - IFN 2 ~ 4 摩尔锌。

1 3 . 根据权利要求 1 2 的结晶锌 - α - 2 - IFN, 其中结晶锌 α - 2 - IFN 是结晶锌 - α - 2 b - IFN。

1 4 . 结晶钴 - α - 2 - IFN。

1 5 . 根据权利要求 1 4 的结晶钴 - α - 2 - IFN, 其中的结晶钴 - α - 2 - IFN 是结晶钴 - α - 2 b - IFN。

1 6 . 当给灵长类皮下注射时, 血清半衰期至少是大约 1 2 小时的结晶 - α - 2 - IFN。

1 7 . 根据权利要求 1 6 的结晶 - α - 2 - IFN, 其中的结晶 - α - 2 - IFN 是结晶锌 - α - 2 - IFN。

1 8 . 根据权利要求 1 7 的结晶锌 - α - 2 - IFN, 其中的结晶锌 - α - 2 - IFN 是结晶锌 - α - 2 b - IFN。

1 9 . 给一个体给药 α - 2 - IFN 的方法, 包括给个体注射结晶 α - 2 - IFN, 其中当给灵长类皮下注射时, 结晶 α - 2 - IFN 的血清半衰期至少为大约 1 2 个小时。

2 0 . 根据权利要求 1 9 的方法, 其中的结晶 α - 2 - IFN 是结晶锌 - α - 2 - IFN。

2 1 . 根据权利要求 2 0 的方法, 其中的结晶锌 - α - 2 - IFN 是结晶锌 - α - 2 b - IFN。

2 2 . 一种制备结晶金属 - α - 2 - IFN 的方法, 包括生成可溶性金属 - α - 2 - IFN 配合物, 在将使金属 - α - 2 - IFN 溶液变为过饱和并生成结晶金属 - α - 2 - IFN 的条件下, 用一种该金属的乙酸盐平衡溶液中的可溶性金属 - α - 2 - IFN 配合物。

2 3 . 根据权利要求 2 2 的方法, 其中的金属选自锌和钴。

2 4 . 根据权利要求 2 2 的方法, 其特征在于通过蒸汽扩散, 液体扩散或温度诱导的方法或这些方法的结合实现平衡作用。

2 5 . 根据权利要求 2 4 的方法, 其中结晶点时, 存在于溶液中的金属 - α - 2 - IFN 配合物的浓度是 5 至大约 80 mg/ml 溶液。

2 6 . 片状形态的锌 - α - 2 - IFN。

2 7 . 针状形态的锌 - α - 2 - IFN。

说明书

结晶金属- α -干扰素

发明背景

本发明涉及蛋白质结晶领域，特别是干扰素类蛋白质结晶作用。

人的 α -干扰素是含有至少24个亚种的一族蛋白质，Zoon K. C, Interferon 9 : 1 (1987), Gresser I., ed. Academic Press, New York。它们最初被描述为能在细胞内诱发抗病毒态的试剂，但现在已知它们是影响免疫系统很多功能的多向性淋巴因子，Opdenakker, 等人, Experimentia 45 : 513 (1989)。除了它们的体外生物活性外，近来人 α -干扰素被用来治疗一些适应症，例如毛细胞性白血病，卡波济肉瘤，尖锐湿疣，乙肝和丙肝。

α -2b干扰素是纯化无菌的，冻干的重组干扰素制剂。从结构的阐明以及各种剂型的制剂，包括开发控制释放制剂角度而言对高度纯化结晶形式 α -干扰素，特别是重组型 α -2b干扰素的需求是最为重要的。

结晶人 α -干扰素的两种形式已有报道，即由 Miller等人, Science, 215 : 689 (1982) ; Kung 等人, U. S. Patent No. 4, 672, 108; Weissmann, The Cloning of Interferon and Other Mistakes, In: Interferon 1981, Ian Gresser, ed., Academic Press, New York, 101~134; Weissmann, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B299: 7 (1982); Nagabhushan, 等人,

'Characterization of genetically Engineered alpha - 2 Interferon', In: Interferon: Research Clinical Application and Regulatory Consideration, Zoon 等人, Elsevier, New York 79 (1982) 报道。这些出版物描述了在低温下由聚乙二醇或通过调节 pH 或温度由磷酸盐缓冲液中结晶 $\alpha - 2$ - 干扰素的方法。Miller 等人的文章还指出结晶 $\alpha - 2$ 干扰素是“棱柱形”的。在国际专利申请 No. PCT/U S 9 1 / 03660 中公开了在 22°C 由蒸汽扩散悬滴实验从硫酸铵溶液中制备 $\alpha - 2$ b 干扰素的单斜棱晶的条件。

一般情况下，通常在医院或诊所， $\alpha - \text{IFN}$ 或者通过皮下或者通过静脉内注射给药。当皮下注射时 $\alpha - \text{IFN}$ 的血清半衰期是 $2 \sim 6$ 小时，当静脉内注射时其血清半衰期是几分钟，并且当随时间测定血液水平时，特征地显示“突出现”或“脉冲”分布图形（即血清水平快速上升，接着血清水平快速清除）。因此该蛋白质经常性给药的剂量一定要保持该药的治疗有效血清浓度。有临床情况，当让该蛋白质连续释放到血液中使该蛋白质的血清浓度达到一坪值且在一段时间内保持该水平，可以在治疗上更有利于开发 $\alpha - \text{IFN}$ 制剂。这就是所谓的控制释放制剂。

至今为止，已知的结晶 $\alpha - \text{IFN}$ 中没有一种具有可控药物传送系统所需要的性质，特别是适于注射的“一般被认为安全”（GRAS）类型制剂中的， 37°C 时限定的溶解度和稳定性。可控释放治疗有许多潜在的优点。主要地，可控释放药物能以较低有效剂量给药，提高了其安全性同时保持或提高了其效力。因为延长的生物利用度为增加的生物分布、加强组织和有机体渗透提供了机会，因此可发掘新的治疗适应症。

因此需要一种 α - IFN 可控释放制剂。

本发明概要

本发明提供了单斜晶形态的结晶锌 - α - 2 - 干扰素 (α - 2 - IFN)。本发明还提供了结晶钴 - α - 2 - 干扰素和当给灵长类皮下注射时, 血清半衰期至少是大约 12 个小时的结晶 α - 2 - 干扰素。

本发明进一步提供了一种制备结晶 α - 2 - IFN 的方法, 包括生成可溶性金属 - α - 2 - IFN 配合物, 在将使金属 - α - 2 - IFN 溶液变为过饱和并生成结晶金属 - α - 2 - IFN 的条件下, 用一种该金属的乙酸盐平衡溶液中的可溶性金属 - α - 2 - IFN 配合物。

本发明包括有单斜晶, 片状和针状形态的结晶金属 - α - IFN。

附图的简要描述

图 1 描述了磷酸盐缓冲液中 α - 2 b 干扰素的血清血液水平, 曲线 10₁ 和结晶锌 - α - 2 b 干扰素的血清血液水平, 借助硫酸鱼精蛋白赋形剂注射时与时间的函数关系, 图 1 2。

本发明的详细描述

本发明涉及 α - 干扰素的金属配合物的新的结晶形态。特别是, 公开了锌和钴的结晶干扰素配合物。这些晶体具有用于药物传送系统所需要的溶解性质, 包括在 37°C 时限定的溶解度, 颗粒范围 $< 200 \mu m$, 以及室温下在适于注射的溶液中的稳定性。用 3.4×10^6 IU 结晶锌 - α - 2 b - IFN 悬浮液进行单次皮下注射, 与 α - 2 b - IFN 非结晶形 INTRON A® (Schering - Plough, Kenilworth New Jersey) 的血清半衰期 2 ~ 3 小时相比, 其测定的消除血清半衰期是 12 个小时, 血清半衰期增长了 4 ~ 6 倍。

可以用几种方法, 例如如蒸汽扩散, 液体扩散, 恒温和温度诱导

或其组合方法使金属-干扰素配合物的过饱和溶液诱发结晶。只在蛋白质浓度，缓冲液浓度，金属离子浓度和温度的窄范围条件下发生结晶作用。可通过在4°至22℃恒温下的蒸汽扩散（悬滴方法），液体扩散（透析和超滤）或通过温度诱导方法（温度随时间由4℃升至22℃）得到这些设计的过饱和条件。优选地用来与 α -2b干扰素配合的金属盐是钴盐或锌盐，且通过恒温或温度诱导实现平衡。

金属- α -IFN配合物的溶液含有一种金属的乙酸盐。该金属的乙酸盐优选选自锌、镉、钾、锂、镁和钴盐，更优选的是乙酸锌。并且通过恒温的方法或者通过温度诱导方法使溶液诱发结晶。在蒸汽扩散和液体扩散实验中，溶液最好与更浓的乙酸锌或乙酸钴溶液平衡。平衡是指较低盐浓度溶液的溶剂渗透性地扩散到有较高盐浓度的另一溶液的溶液中，以使得两溶液中盐浓度达到平衡的过程。结晶开始形成时，存在于结晶 α -2-IFN溶液中的乙酸盐的浓度优选为大约60mM至大约140mM，更优选乙酸盐浓度是大约80mM至大约100mM。如下文所述，蒸汽扩散或液体扩散实验时，平衡过程起始时乙酸盐的浓度较低，即为大约20mM至大约70mM。

优选 α -2-IFN是 α -2b-干扰素，更优选的是人重组 α -2b-干扰素。在一实施方案中，所用材料是具有序列ID NO: 1所示氨基酸序列的 α -2b-干扰素。

也可以使用 α -2a-IFN。 α -2a干扰素的初级氨基酸序列与上述 α -2b-IFN序列不同，在23位残基上用赖氨酸取代了精氨酸。

α -2-干扰素的乙酸盐溶液优选包括pH5.0至7.0，更优选pH5.5至6.5的缓冲液，如35mM乙酸钠，pH6.0的缓冲溶液。

如上所述，本发明方法包括在所设计的产生过饱和和结晶的条件下，制备金属- α -2-IFN可溶的配合物。用几种结晶方法，如恒温下蒸汽扩散，液体扩散和温度诱导或这些方法的组合能达到过饱和条件。在蒸汽扩散方法中，锌- α -2-IFN配合物与将使锌- α -2-IFN溶液变为过饱和的并在恒温下生成 α -2-干扰素晶体的乙酸盐溶液平衡。在液体扩散方法中，在恒温下，乙酸锌缓冲液中的锌- α -2-IFN配合物对较高浓度乙酸锌缓冲液透析。在温度诱导方法中，通过使温度由4℃升至22℃，使金属乙酸盐缓冲液中的金属- α -IFN溶液产生结晶。

可以使用任何合适的 α -2-IFN，例如 α -2a-IFN和 α -2b-IFN，更优选人重组 α -2b-IFN(γ -h- α -2a-IFN)或 α -2b-IFN(γ -h- α -2b-IFN)。商业上可获得的 α -2-IFN制品可由Hoffmann-LaRoche (ROFERON®)和Schering-Plough (INTRON A®)买到。含有 α -2-IFN的纯干扰素类的混合物可由Burroughs-Wellcome Corporation (WELLFERONS®)购得。由于人 α -IFN高度序列同源性，本发明方法适用于每一亚种。

可以通过重组DNA技术或可以从自然源(例如人外周血液淋巴细胞，人成淋巴细胞瘤疹(lymphoblastoid)细胞系)提纯得到人 α -2-IFN亚种，例如，如在Pestka, 等人, Ann. Rev. Biochem., 56:727(1987)中所描述的。优选的 α -2-IFN是具有SEQ ID NO: 1氨基酸序列的 γ -h- α -2b-IFN。

已经从几种细胞源纯化得到了天然人 α -IFN，包括由全血，新生期纤维细胞，成淋巴细胞瘤疹和各种白血病细胞系分离出的白细胞。人白细胞干扰素的第一种临床上可获得的制剂是由芬兰的K. Cantell

及其同仁研究出的，是将取自正常志愿者的血液离心，用干扰素与抗原接触，通过加入仙台（Sendai）病毒，诱导产生 α -IFN，并且离心。用硫氰酸钾沉淀所得的上清液，用乙醇萃取，pH沉淀，对磷酸盐缓冲盐水透析，来得到纯化的 α -IFN，K. E. Morgensen，等人，*Pharmacol, Ther.* 1 : 369 (1977)。

重组 α -INF已被几组大肠杆菌（E. Coli）克隆和表达，例如，C. Weissmann等人，*Science* 209 : 1343 (1980)。重组 α -IFN的纯化已由几组使用色谱步骤如硫酸铵沉淀，染色亲和色谱，离子交换和凝胶过滤的结合描述过，例如，象Weissmann, C, *Phil R. Soc. (London)*, b299 : 7 (1982)中所描述的。一种可选择的纯化重组 α -IFN的方法使用了固定化抗体的免疫亲和层析，P. P. Trotta等人，*Developments in Industrial Microbiology* 72 : 53 (Elsevier Amsterdam 1987)。用于重组 α -干扰素的可行的纯化方案的综述见T. L. Nagabhushan and P. P. Trotta, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* A14, VCH : 372 (Weinheim, Federal Republic of Germany 1989)。优选以常规纯化方法纯化所用的 α -2b-IFN，如Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*中描述的方法，然后再进行反相高效液相色谱。

结晶 α -IFN蒸汽扩散的合适的方法包括使用滴液法，例如悬滴或夹滴。可以实现金属- α -2-IFN乙酸盐溶液与具有比第一种溶液高的乙酸盐浓度的另一乙酸盐溶液之间的蒸汽平衡。优选平衡作用缓慢发生，例如历经1小时至30天。

用类似蒸汽扩散来达到过饱和的其它方法，即液体扩散，例如透

析和超滤，可以实现大量结晶。也可以用温度诱导实现结晶，即随着温度的提高，金属-干扰素的非结晶悬浮液或溶液过饱和，然后晶核形成且结晶生成。在临床制备时，大量的结晶可作为纯化或浓缩步骤。

在结晶点，即第一颗晶粒生成时的点，乙酸盐溶液中 $\alpha-2$ -IFN的终浓度可以在大约5至大约80 mg/ml的范围。更优选， $\alpha-2$ -IFN的浓度是约5至大约50 mg/ml。优选 $\alpha-2$ -IFN的初始浓度是大约40 mg/ml。

在蒸汽扩散方法中，在结晶作用发生前的初始阶段， $\alpha-2$ -IFN溶液中金属乙酸盐的浓度可以是大约10至大约70 mM的范围。更优选， $\alpha-2$ -IFN溶液中金属乙酸盐的浓度为大约20至大约45 mM。在抗衡溶液中，结晶作用起始时，乙酸盐的浓度是大约60至大约140 mM，更优选为大约80至大约100 mM。

$\alpha-2$ -IFN溶液和抗衡乙酸盐溶液的pH优选控制在大约4.0至大约7.0的范围内，更优选大约5.5至大约6.5。任何合适的非金属螯合缓冲剂都能用于此目的。例如可以使用乙酸钠，HEPES（N-2-羧乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸）和MES（2-[N-吗啉代]乙磺酸）缓冲液。

优选在对蒸汽扩散和液体扩散法控制温度梯度下进行结晶。采用蒸汽扩散法时，优选温度范围为约7℃至约22℃，更为优选的范围为约6℃至约14℃，在约9℃时通常可观察到晶核形成。

对于温度诱导法，优选在瞬时至几天的时间范围内将温度从1℃升至40℃。优选在1至10天间温度以线性梯度形式由4℃升至22℃。更为优选的方案是在1至10天间从4℃升至18℃。

以本发明方法制备的结晶 $\alpha - 2 - \text{IFN}$ 是配制各种药物制剂的基础。例如，结晶的 $\alpha - \text{IFN}$ 可用于控制释放制剂中，即一种适于皮下、肌肉或病灶内 (intralesional) 注射的贮库制剂 (depot preparation)，它可释放出相当于 $0.1 - 1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的日剂量。使用本发明方法制备的晶体的贮库制剂同包含低于 4°C 条件下制得的现有技术的结晶的制剂相比，显示出的溶解速率要低得多。尤其是本发明周围温度 (22°C) 的晶体比要求低温条件形成结晶的晶体对温度的敏感性低。制剂可含生理有效量的结晶 $\alpha - 2 -$ 干扰素和惯用的药物可接受载体。也可以设想将结晶蛋白的控制释放效果与其他控制释放技术如微胶囊化结合使用。例如，结晶蛋白可包埋于 Poly [dl - lactic - coglycolic] acid 或脂质体中。

实施例

下列实施例用于解释本发明，但并不限制本发明范围。

下列实施例所用的 $\alpha - 2 - \text{IFN}$ 是在 E. Coli 中表达的重组人 $\alpha - 2 \text{ b} -$ 干扰素，描述于 Weissmann 等，Science, 209 : 1342 (1980) 中。按先前在 Leibowitz, P. 等人在美国专利 US 4, 315, 852 中报道的方法进行细胞培养，收集和提取。结合使用传统的纯化步骤来纯化得到的提取液：乙醇提取，基质凝胶蓝配体亲和层析，离子交换和凝胶过滤层析。所得纯化的 $\alpha - 2 \text{ b} - \text{IFN}$ 制备液以 USP 级水或以 0.1% 三氟乙酸溶液透析，并分别冻干成游离碱或三氟乙酸盐。

实施例 1

单斜晶形态的结晶 $\alpha - 2 \text{ b} - \text{IFN}$ 的制备

使用 Kenyon 等在 1992 年 1 月 17 日提交的美国专利申请 No. 07/822, 504, 1992 年 10 月 6 日提交的国际专利申请 No. PCT/US 92/

08296中公开的自动结晶系统，6 μ l含20 mg/ml的 α -2 b-IFN的17 mM乙酸钠，17 mM乙酸锌（pH为5.5）的液滴悬浮于一硅化结晶室中的上盖。此上端平板置于结晶室的涂有润滑脂的下部结构上，结晶室位于一小槽的正上方，槽中有1 ml 35 mM乙酸钠，35 mM乙酸锌、pH为5.5的溶液。22 $^{\circ}$ C下保温5-6天后可明显观察到大单斜晶体。

实施例 2

单斜晶形态结晶的锌- α -2 b-IFN的制备

单斜晶形结晶锌- α -2 b-IFN可用另一种方法制备。在该方法中，锌- α -2 b-IFN结晶条件为，含20 mg/ml α -2 b-IFN的2.5 mM乙酸钠，37.5 mM乙酸锌，pH6.1的10 μ l液滴悬浮于一18 mm的圆形硅化盖玻片上。含有1 ml 5 mM乙酸钠，75 mM乙酸锌，pH6.1的溶液的结晶室，围绕其边缘涂一圈高真空润滑脂，并用硅化盖玻片封口，这样悬滴便悬挂于结晶室上部，悬挂于乙酸盐溶液上部。12 $^{\circ}$ C保温后5-6天即产生大的单斜晶。

实施例 3

单斜晶形结晶的锌- α -2 b-IFN的制备

用另一种方法生产单斜晶形锌- α -2 b-IFN。在该方法中，含20 mg/ml α -2 b-IFN的4.5 mM乙酸锌，pH6.1的10 μ l液滴悬浮于硅化盖玻片上。结晶室含有1 ml 90 mM乙酸锌，pH6.1，并用高真空润滑脂将该悬有液滴的盖玻片封口，液滴悬挂于结晶室和乙酸锌溶液上方。12 $^{\circ}$ C保温后5-6天内即产生大单斜晶。

实施例 4

单斜晶 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 的 X 射线衍射数据

将根据实施例 1 制备的 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 单斜晶置于毛细玻璃管中， 22°C 时使用 40KV 和 100mA 操作的由 Rigaku RU - 300 旋转阳极发生器产生的 $\text{CuK}\alpha$ 射线进行 X - 射线分析。用同样的辐射源在 Nicolet X - 100A 表面积探测器上收集原始数据。

晶体对于 X - 射线衍射分析稳定，衍射分辨率为约 $2.7 \times 10^{-10}\text{m}$ (\AA)，但在分辨率为大约 $3.2 \times 10^{-10}\text{m}$ (\AA) 时，数据变得非常弱。不同批的晶体均做 X - 衍射分析得出晶体形态的分析结果一致。用晶胞参数值标明晶体空间群 $P2_1$ ，这些参数为 $a = 63.1 \times 10^{-10}\text{m}$ (\AA)， $b = 76.6 \times 10^{-10}\text{m}$ (\AA)， $c = 151.4 \times 10^{-10}\text{m}$ (\AA)， $\alpha = 90^\circ$ ， $\beta = 91.2^\circ$ 及 $\gamma = 90^\circ$ 。此为单斜晶形的金属 α 干扰素的首次报道。

实施例 5

液体扩散结晶法 (片晶)

为使结晶悬浮液具有控制释放施用的应用性，必须可能生产出毫克级至克级的晶体。上述悬滴法的蒸发扩散法不能提供这样量级的结晶蛋白。因此，使用液体透析法进行 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 结晶，这是模仿悬滴法的蒸发扩散法建立的实验。使用一切割分子量为 5000KD 的微透析袋 (Pope Scientific Inc., Menomonee Falls, Wisconsin) 将 0.5ml 的 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ (40mg/ml)， 35mM 乙酸钠 $\text{pH} 5.5$ 的溶液在 2.7升 35mM 乙酸钠 $\text{pH} 5.5$ 的溶液中进行透析，温度为 22°C 。在 22°C 在两天的期间内，滴加缓冲至 $\text{pH} 5.5$ 的乙酸锌溶液 (0.3M)。滴加的目的是缓慢提高 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 溶液中乙酸锌的水平至 35mM 。

乙酸锌溶液加入 1 - 2 小时后可观察到悬浮液中出现沉淀。每天用显微镜观测悬浮液。2 周后可发现悬浮液中出现少量片状物。每天悬浮液中的晶片数目都会增多（平均大小：70 μm ）直至 3 周后悬浮液中含晶体量约为 90 %。

实施例 6

液体 - 扩散结晶法（片晶）

用一切割分子量为 5000KD 的微透析袋（Pope Scientific Inc., Menomonee Falls, Wisconsin）将 0.5ml 在 3.5 mM 乙酸钠 pH 5.5 溶液中的 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 的浓度为 40 mg/ml 的 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 溶液在 2.7 升由 3.5 mM 乙酸钠和 3.5 mM 乙酸锌组成的，pH 5.5 的缓冲液中进行透析。所得悬浮液在 22 °C 保温 3 周。通过显微镜观察 3 - 4 周时可见到大量片状晶体。

实施例 7

温度诱导结晶法（片晶）

用 1 M NaOH 在 4 °C 时将 0.5ml 在 3.5 mM 乙酸钠，pH 5.0 溶液中 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 的浓度为 40 mg/ml 的 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 溶液调至 pH 6.0。所得悬浮液浸放于冷却水浴 / 循环器（#RTE - 110 型，Neslab Instruments, Inc., Newington, N. H.）中。水浴温度以一线性梯度形式在 4 天内升至 22 °C。用显微镜观察 4 天后可见到大量的片形晶体。

实施例 8

结合使用蒸汽扩散和温度诱导法

制备结晶的锌 - $\alpha - 2b - \text{IFN}$

结合使用蒸汽扩散和温度诱导法生产单斜棱晶形的结晶锌 - $\alpha -$

2 b - IFN。在该方法中，4 °C 时含有 20 mg/ml α - 2 b - IFN 的 40 mM 乙酸锌，pH 6.0 溶液的 10 μ l 液滴被悬浮于一硅化盖玻片上。结晶室内含 1 ml 80 mM 乙酸锌，pH 6.0 的溶液。在悬有小滴的盖玻片处用高真空润滑脂密封，小滴悬于结晶室上方。将整个结晶室放置于一温度为 12 °C 的保温箱中。12 °C 保温后 3 - 5 天内即有大的单斜晶产生。

实施例 9 - 14

性质

用物理生物化学的手段开始测定锌 α - 2 b - IFN 晶体的性质，以确定溶解后分子的完整性，蛋白锌含量和保存的生物活性。

实施例 9

蛋白质分析

一等量样份的由实施例 3 的方法制备的锌 - α - 2 b - IFN 晶体被置于 2 升 35 mM 乙酸锌 pH 5.5 的溶液中 22 °C 时透析 4 天以移去未形成配合物的乙酸锌。离心该悬浮液并用 Pasteur 移液管移去洗涤溶液。洗涤过的晶体重新溶于 22 °C 8 M 盐酸胍溶液中，用纯净的人 α - 2 b - IFN 作为参比标准，采用改进的 Bradford 分析法确定蛋白质浓度。Bradford 分析：改进标准考马斯亮蓝染色结合分析以使吸光度直接与蛋白含量成正比。详细情况见 Bradford, M., Anal. Biochem. 72 : 248 (1976)。

实施例 10

HPLC

对等量样份的根据实施例 3 的方法制备的重新溶解的 α - 2 b - IFN 晶体进行高效液相色谱 (HPLC) (Waters Ass., Milford, MA)

分析。样品加于RAININ DYNAMAX C_4 $300 \times 10^{-10} \text{m}$ (\AA) 柱子 ($4.6 \times 250 \text{mm}$) 中, 然后用 27-72% 乙腈的 0.1% 的三氟乙酸溶液在 30 分钟时间内进行线性梯度洗脱, 用 Gilson 可变波长监测器在 280nm 处以灵敏性 0.02 个吸收光度来监测洗脱。重新溶解的结晶溶液和结晶前原始 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 制备液的保留时间和色谱图形难以区分。

实施例 11

SDS - PAGE 分析

收集根据实施例 1 的蒸汽扩散悬滴实验得到的晶体, 将其离心并洗涤数次以移去任何可溶性 $\alpha - \text{IFN}$ 。被离心分离的晶体溶解于含十二烷基硫酸钠的缓冲液中, 所得溶液进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE), Laemmli, U. K. Nature, 227 : 680 (1970)。与样品 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 对比。溶解的晶体与对比样品 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 在分子量上没有明显变化。基于这些结果可知在结晶过程或此后的溶解状态中 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 没有化学或酶学性质上的改变。

从上述实施例 10 和 11 的结果, 可以得出结论: 在结晶或重新制备过程中蛋白质不会产生化学变化或任何变性。

实施例 12

锌 - $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 的物理性质

通过显微镜观察由实施例 1 制备的晶体在 37°C (体温) 和 4°C 时的稳定性, 以探测其是否适合用于控制释放制剂中。还观察晶体在不同 pH 值的无锌缓冲液中 18 小时时间的稳定性。发现晶体在 37°C 和 4°C 时稳定存在 24 小时, 且在 pH 5.0-6.0 时稳定。这点明显区别于初始的结晶 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 制备液, 尤其不同于 Nagabhushan, 等 "Characterization of genetically Engineered alpha - 2

Interferon, 在: Interferon : Research, Clinical Application and Regulatory ” 中公开的晶体, 其在 pH 高于或低于 6.0 及 4 °C 时在 pH 6.0 时很快溶解。

实施例 1 3

配合的锌与干扰素含量的摩尔比

设计实验以确定配合的锌与 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 的摩尔比。等量样份的根据实施例 3 制备的锌 - $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 晶体溶液被置于 2 升 35 mM 乙酸钠, pH 5.5 的溶液中透析 4 天, 移去未形成配合物的乙酸锌。向洗过的悬浮液中加入 8.0M 的盐酸胍溶液以溶解配合物。所得溶液以 Bradford 法分析蛋白含量。一份相同悬浮液样品用于原子吸收光谱分析 Zn 含量、发现锌离子与 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 的摩尔比为 3.1 比 1。随后制备的锌 - $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 样品分析结果为锌离子与 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 的摩尔比为 2 至 4。

实施例 1 4

细胞病变效应抑制分析

为确定结晶的 $\alpha - 2b - \text{IFN}$ 是否仍保持其生物活性, 进行了细胞病变效应抑制分析。所用病毒为脑心肌炎病毒 (EMC), ATCC 株 VR-129B, 该病毒生长于 Vero 细胞的单层培养物中并在培养基 A 中冻干保存 (培养基 A 含 950ml 带 Earle 平衡盐溶液的 Minimum Essential Medium Eagle (Gibco Inc.), 100ml 胎牛血清, 36ml 7.5% 碳酸氢钠, 20ml 1M HEPES 缓冲盐水, 20ml 200mM 的 L-谷氨酰胺和 10ml 青霉素和链霉素 (10000 单位青霉素 K / ml 和 10000 μg 硫酸链霉素 / ml)。组织培养摇瓶中汇合在一起的 FS-71 细胞单层培养物以 Hank 平衡盐溶液洗涤, 并用 2.5% 的胰蛋白酶溶液在 37 °C

保温 10 分钟。含有细胞的胰蛋白酶溶液以培养基 A 稀释，使细胞浓度为 3.5×10^5 ，用于下述分析方法中。

干扰素分析：抗病毒生物分析的全部过程在一 96 孔微量滴定板上进行。被测样放于适当的孔中并以 1 : 2 比例在整个板上进行系列稀释。每板 24 孔装有培养基 A 作为病毒和细胞对照孔。此外，作为实验标准的 600IU/ml $\alpha - 2b$ - 干扰素的溶液被稀释至 1 IU/ml，此为对病毒细胞病变具有 50% 防护水平必需的浓度值，所有分析中都包括此标准样，以便在分析中测定并比较样品相对的抗病毒活性。然后，每一小孔中接种含约 3.5×10^4 细胞的 0.1ml 的培养基 A。微量滴定板加盖并在 37℃，5% CO₂ 中保温 4 小时。除了细胞对照孔外所有的孔都感染有 EMC 病毒，病毒浓度为感染后 16 - 18 小时可导致 90 - 100% 的细胞病变，即约有 1.54×10^4 个斑形成单元。重新将该微量滴定板加盖并于 37℃，5% CO₂ 条件下保温，直至病毒对照孔显示出至少 90% 的细胞病变效应 (CPE)。将培养基从每孔中吸出并将细胞单层培养物以 0.1ml 结晶紫液制剂染色约 30 分钟。倒出结晶紫后，将微量滴定板轻轻用水洗涤并在空气中凉干。使用和不使用显微镜观察单层培养物，将病毒和细胞对照孔打分为 1 至 4+ (1 = < 10% CPE, 4+ = > 90% CPE)。试验板上每一显示出与对照孔相应反应的样品被打分分级。每一样品孔的级值由观测结果和与标准孔对比结果组成。样品的 50% 终点值是通过直接与标准样 50% 终点对比而得，该标准样与所选的样品孔是最匹配的。样品 50% 终点与标准样的 50% 终点相比的偏差得出相对于标准的滴度值的估计值。由此，X 孔偏差 [X = (50% 样品孔号) - (50% 标准孔号)] 转换的效力为 2^x 倍的标准样效力。

有关分析实验的调节描述于S. Rubinstein, P. C. Familetti and S. Petska, J. Virol, 37 : 755 (1981)。

实施例 1 5

Zn- α -2 b-干扰素在鱼精蛋

白赋形剂中的控制释放能力

设计出体内实验，以检测结晶的悬浮液在适于皮下注射的GRAS制剂中的控制释放能力。使用根据实施例 7 方法制备的 α -2 b-IFN，在 10 mM 乙酸钠、10 mM 乙酸锌、0.4 mM 硫酸鱼精蛋白，pH 5.5 的缓冲液中制备无菌锌- α -2 b-IFN 结晶悬浮液 (34×10^6 IU/dose)。在两只 Cynomolgus 猴子的腰背部皮下注射该悬浮液。用细胞病变效应抑制分析 (CPE)，以在 1、3、6、10、24、48 和 72 小时监测干扰素的血液血清水平作为对时间的函数作图。

见图 1 曲线 1 2，其显示了两只猴子的 α -IFN 平均血清水平，由 CPE 分析值对时间的函数来测定。

实施例 1 6

对比实验

实施例 1 5 得到的实验结果不同于使用在普通含盐的磷酸盐缓冲液中制备的非结晶 α -2 b-IFN 进行的此项实验的结果。在 Cynomolgus 猴的腰背部以 50×10^6 IU/针的剂量进行皮下注射。在 0、1、3、6、10、24、48 和 72 小时测量血液血清中的干扰素水平。将数据做图见图 1 的曲线 1 0，其通过以 CPE 分析值作为对时间的函数测定显示出 α -IFN 的血清水平。

由实施例 1 5 和 1 6 可以得出结论，即在鱼精蛋白载体中使用结晶的锌- α -IFN，相对于实施例 1 6 所描述的现有技术的 α -IFN 制

剂延长了 α - IFN 在血液血清中可测水平。并且，这些数据表明 Zn 干扰素结晶悬浮液用作控制释放制剂的实用性。该结晶配合物能通过液体透析法或温度诱导法进行大量生产。此大规模的工艺过程可生产出注射产品所需的 $1 - 200 \mu m$ 大小的结晶（可与结核菌素一同注射）。

表 1

猴体中结晶 IFN 悬浮液与非结晶 IFN 的药物动力学曲线

		图 1	图 1
		曲线 1 0	曲线 1 2
C _{max}		8000	1500
T _{max}		3	3
AUC(tf)		20225	16812
t _f		6	24
C _{max}	IU/ml	最大血浆浓度	
T _{max}	hr.	最大血浆浓度对应的时间	
AUC(tf)	IU.hr/ml	从时间 0 至最终可测样品时间血浆浓度 - 时间曲线下的面积	
t _f	hr.	最终可测样品的时间	

表 2

相对于时间的血清水平 (CPE)

时间 (小时)	图 1	图 1
	曲线 1 0	曲线 12 (平均值)
0	0	0
1	0	676
3	8000	1500
6	150	900
10	0	114
24	0	0
48	0	0
72	0	0

实施例 1 7

钴 - α - 2 b - IFN 配合物结晶

使用Kenyon等人在1992年1月17日提交的美国专利申请No. 07/822, 504, 1992年10月6日提交的国际专利申请No. PCT/US 92/08296中所公开的自动结晶系统, 将含有20mg/ml的 α - 2 b - 干扰素的17mM乙酸钠、22mM乙酸钴, pH4.6溶液的6 μ l的液滴悬浮于硅化结晶室的上盖上。此上盖放置于结晶室的涂有润滑脂的下部结构上, 结晶室位于一含有1ml 35mM乙酸钠、45mM乙酸钴, pH4.6的小槽的正上方。22℃保温后5 - 6天即可用显微镜观察到晶体出现。

实施例 1 8

在结晶缓冲液中使用乙酸锂制

备结晶的锌 - α - 2 b - IFN

将含有 20 mg/ml 的 α - 2 b - IFN 的 37.5mM 乙酸锌, pH 6.1, 2.5mM 乙酸锂溶液的 10 μ l 液滴悬浮于硅化盖玻片下面。结晶室内含有 1 ml 7.5 mM 乙酸锌, pH 6.1, 5.0mM 乙酸锂, 并以高真空润滑脂在盖玻片处密封。12 $^{\circ}$ C 保温后 5 ~ 6 天即出现单斜晶形晶体。

实施例 1 9

在结晶缓冲液中使用乙酸钾制

备结晶的锌 - α - 2 b - IFN

将含有 20 mg/ml 的 α - 2 b - IFN 的 37.5mM 乙酸锌, pH 6.1, 2.5mM 乙酸钾溶液的 10 μ l 液滴悬浮于硅化盖玻片下侧。结晶室含有 1 ml 7.5 mM 的乙酸锌, pH 6.1, 5.0mM 的乙酸钾, 并以高真空润滑脂在盖玻片处密封。12 $^{\circ}$ C 保温后 5 ~ 6 天即可发现大的单斜晶形晶体。

尽管结合上述特定的实施方案, 对本发明进行了描述, 但许多针对本发明进行的替换、修改和变换对本领域普通技术人员而言是显而易见的。所有这样的替换、修改和变换均属本发明的思想和范围。

序列表

(1) 一般信息:

- (i) 申请人: Schering Corp.
- (ii) 发明名称: 结晶金属 - α - 干扰素
- (iii) 序列数: 1
- (iv) 通信地址:

(A) 地址 : Schering - Plough Corporation

(B) 街道 : One Giralda Farms

(C) 城市 : Madison

(D) 州 : New Jersey

(E) 国家 : USA

(F) 邮政编码 : 07940

(v) 计算机可读形式 :

(A) 介质类型 : 软盘

(B) 计算机 : Apple Macintosh

(C) 操作系统 : Macintosh 6.0.8

(D) 软件 : Microsoft Word 5.1a

(vi) 现申请数据 :

(A) 申请号 : 待给

(B) 申请日 : 即日

(C) 分类 :

(vii) 优先权申请数据 :

(A) 美国申请号 : 08 / 08 / 024,330

(B) 申请日 : 1993. 2. 25

(viii) 代理机构 / 代理人信息 :

(A) 姓名 : Lunn, Paul G.

(B) 登记号 : 32, 743

(C) 参考 / 档案号 : JB0287K

(ix) 电信信息 :

(A) 电话 : 201 822 7255

(B) 电报 : 201 822 7039

(C) 电传 : 219165

(2) 序列ID NO : 1信息 :

(i) 序列特征 :

(A) 长度 : 165 氨基酸残基

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(ii) 分子类型 : 肽

(xi) 序列ID NO : 1的序列描述 :

Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu	Met	
				5					10					15		
Leu	Leu	Ala	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Cys	Leu	Lys	Asp	
			20					25					30			
Arg	His	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Gln	Glu	Glu	Phe	Gly	Asn	Gln	Phe	Gln	
		35					40					45				
Lys	Ala	Glu	Thr	Ile	Pro	Val	Leu	His	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Ile	Phe	
	50					55					60					
Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr	Leu	
65					70				75						80	
Leu	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	
				85					90					95		
Ala	Cys	Val	Ile	Gln	Gly	Val	Gly	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Met	Lys	
			100					105					110			
Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val	Arg	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	
		115					120					125				
Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Pro	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	
	130					135					140					
Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu	Ser	
145					150					155					160	
Leu	Arg	Ser	Lys	Glu												
				165												

说明书附图

图 1.

